

10/554158

JC09 Rec'd PCT/PTO 21 OCT 2005

Express Mail Label No.

Dated: \_\_\_\_\_

Docket No.: 09857/0203487-US0 (PATENT)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Shigeki Sasaki.

Application No.: Not Yet Known

Confirmation No.: Not Yet Known

Filed: Concurrently Herewith

Art Unit: Not Yet Known

For: THIONUCLEOSIDE S-NITROSYL  
DERIVATIVE

Examiner: Not Yet Assigned

**AFFIRMATION OF PRIORITY CLAIM**

Mail Stop PCT  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

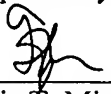
Applicants hereby claim priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2003-117569	April 22, 2003

A certified copy of the aforesaid Japanese Patent Application was received by the International Bureau on April 29, 2004 during the pendency of International Application No. PCT/JP2004/003337. A copy of Form PCT/IB/304 is enclosed.

Dated: October 20, 2005

Respectfully submitted,

By  (53,970)  
Chris T. Mizumoto

Registration No.: 42,899  
DARBY & DARBY P.C.  
New York, New York 10150-5257  
(212) 527-7700/(212) 753-6237 (Fax)  
Attorneys/Agents For Applicants

12. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

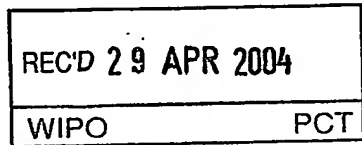
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   4 月 2 2 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 1 1 7 5 6 9  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 1 1 7 5 6 9 ]

出   願   人      株式会社産学連携機構九州  
Applicant(s):

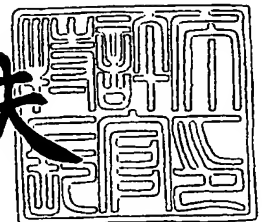


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月 1 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0049

【提出日】 平成15年 4月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H 19/00

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県古賀市千鳥 1-4-8-1012

    【氏名】 佐々木 茂貴

【特許出願人】

    【識別番号】 800000035

    【氏名又は名称】 株式会社産学連携機構九州

【代理人】

    【識別番号】 100092783

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小林 浩

    【電話番号】 03-3273-2611

【選任した代理人】

    【識別番号】 100095360

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

    【識別番号】 100093676

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

    【識別番号】 100120134

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 大森 規雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

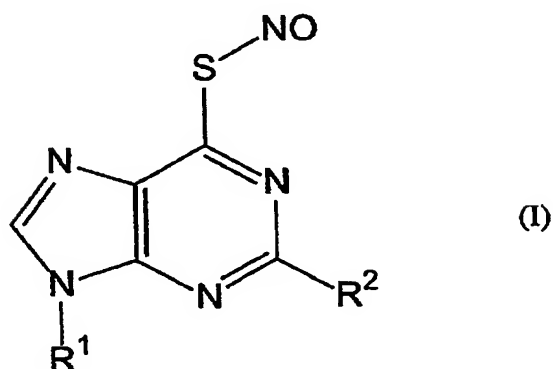
【書類名】 明細書

【発明の名称】 チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次式 (I) :

【化 1】

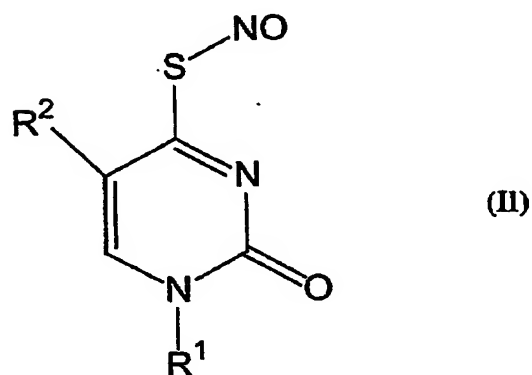


〔式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基 (R³は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1~15のアシル基を表す。) を表す。〕

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

【請求項 2】 次式 (II) :

【化 2】



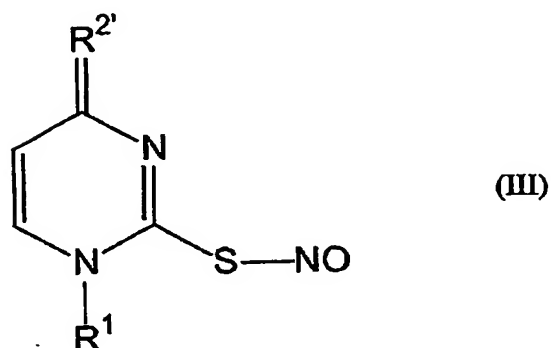
〔式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基 (R³は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換さ

れてもよい炭素数 1～15 のアシル基を表す。) を表す。]

で示されるチオヌクレオシドー S-ニトロシル誘導体又はその塩。

【請求項 3】 次式 (III) :

【化 3】

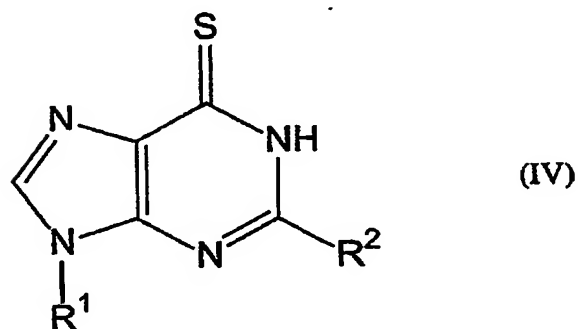


(R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

で示されるチオヌクレオシドー S-ニトロシル誘導体又はその塩。

【請求項 4】 次式 (IV) :

【化 4】

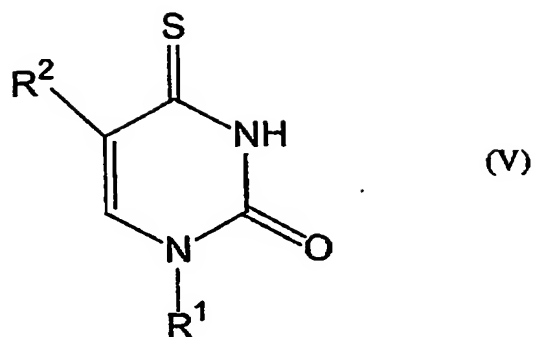


[式中、R¹はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R²は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R³-オキシ基又はR³-アミノ基 (R³は、置換されてもよい炭素数 1～15 のアルキル基又は置換されてもよい炭素数 1～15 のアシル基を表す。) を表す。]

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシドー S-ニトロシル誘導体の製造方法。

【請求項 5】 次式 (V) :

【化5】

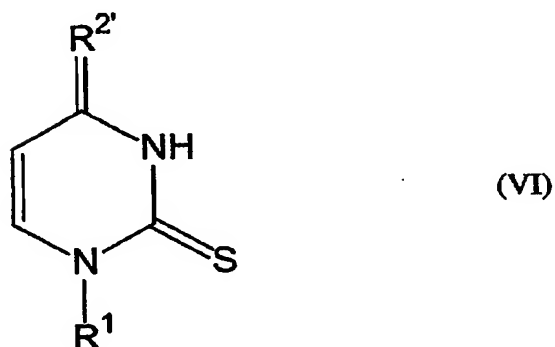


〔式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基( $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1~15のアシル基を表す。)]を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

【請求項6】 次式(VI)：

【化6】



( $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^{2'}$ は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

【請求項7】 請求項1~3のいずれか1項に記載の誘導体又はその塩を含むオリゴ核酸。

【請求項8】 少なくとも12塩基の長さを有するものである請求項7記載

のオリゴ核酸。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させることにより、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその相補鎖中の対応塩基に転移させることを特徴とするニトロシル基の転移方法。

【請求項 10】 請求項 7 又は 8 記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させ、得られる反応産物を酸性条件下で処理することを特徴とする塩基配列の変異誘発方法。

【請求項 11】 塩基配列が、オリゴ核酸中の誘導体に対応する塩基配列である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】 変異がウラシルへの変異である請求項 10 又は 11 記載の方法。

【請求項 13】 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の誘導体並びに請求項 7 及び 8 記載のオリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、塩基配列の変異誘発剤。

【請求項 14】 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の誘導体並びに請求項 7 及び 8 記載のオリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも 1 つを含む、塩基配列の変異誘発用キット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の所属する技術分野】

本発明は、核酸を操作する技術の分野に属し、特に、特定の塩基を認識して配列特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸を得るのに有用な新規な化合物であるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

特定の遺伝子の核酸に対して、その核酸配列に特異的なオリゴ核酸あるいは核酸類似体の特異的に結合させ、化学結合を形成し、遺伝子発現を制御する方法が知られている（「ゲノムケミストリー」、関根/斉藤編、講談社、2003年、東京（非特許文献 1）など）。特に最近、化学結合の構造によっては結合部位におい



て点変異を誘起できることが示された（例えば、Nagatsugi, F., Sasaki, S., Miller, P. S., Seidman, M. M., Nucl. Acid Res, Vol. 31(6), e31(2003)（非特許文献2）など）。このように配列特異的に点変異を誘起する方法は、生化学的な実験ツールとして利用されるばかりでなく、遺伝子の異常を含む様々な病気の根本的な治療に応用できる可能性があることから、生化学および医学・薬学の分野において大きな関心が持たれている。

#### 【0003】

一方、一酸化窒素(NO)は細胞内情報伝達物質として重要な働きをもっている（例えば、L. J. Ignarro, Pharmacology & Toxicology, 67(1), 1, (1990)など）。また生体内ではS-ニトロソチオールが一酸化窒素(NO)運搬体として作用していると考えられている（例えば、D. L. H. Williams, Acc. Chem. Res., 32, 869(1999)など）。一酸化窒素(NO)は、情報伝達の役割以外に生体内で酸化剤として作用し、DNA又はRNA中の塩基と反応し、点変異の原因となることがあると考えられている。そして、化学的な実験では、非特異的に変異が誘起されることが示されている（例えば、J. L. Caulfield, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, J. Biol. Chem. 273(21), 12689 (1998)（非特許文献3）；N. Y. Tretyakova, S. Burney, B. Pamir, J. S. Wishnok, P. C. Dedon, G. N. Wogan, S. R. Tannenbaum, Mutation Research 447(2), 287 (2000)（非特許文献4）など）。

#### 【0004】

最近、修飾オリゴヌクレオチドを用いてミスマッチを含む2重挿入部分を作製し、DNA鎖交換によるDNA修復方法が報告された(M. D. Drury, E. B. Kmiec, Nucleic Acids Research 31(3), 899 (2003)（非特許文献5））。しかしながら、この方法は、モデル実験系であるものの修復効率が低く、また細胞系への展開に関しても多くの解決すべき課題を持っている。

#### 【0005】

##### 【非特許文献1】

ゲノムケミストリー、関根/斉藤編、講談社、2003年

#### 【0006】

##### 【非特許文献2】

Nagatsugi, F. et al., Nucl. Acid Res, Vol. 31(6), e31(2003)

【0007】

【非特許文献3】

J. L. Caulfield et al., J. Biol. Chem. 273(21), 12689 (1998)

【0008】

【非特許文献4】

N. Y. Tretyakova et al., Mutation Research 447(2), 287 (2000)

【0009】

【非特許文献5】

M. D. Drury et al., E. B. Kmiec, Nucleic Acids Research 31(3), 899 (2003)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体、標的核酸に特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸及び配列特異的変異誘発方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、天然の核酸塩基の基本構造のカルボニル基をチオカルボニル基に変換した構造を組み込んだオリゴヌクレオチドを利用し、ニトロシル化を行うことによって新規なニトロシル化合物を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功した。さらに、このオリゴヌクレオチドが配列特異的にかつ塩基特異的に、ニトロシル基を転移させることを見出し、本発明を完成するに至った。

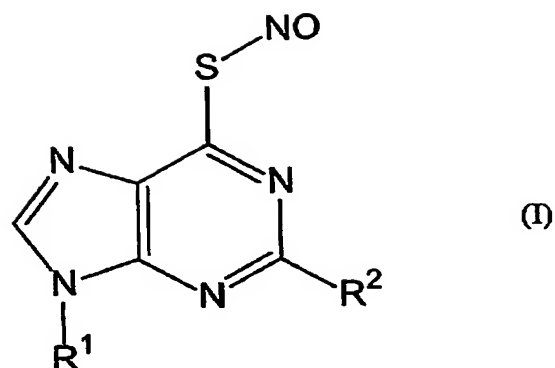
【0012】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) 次式 (I) :

【0013】

【化7】



【0014】

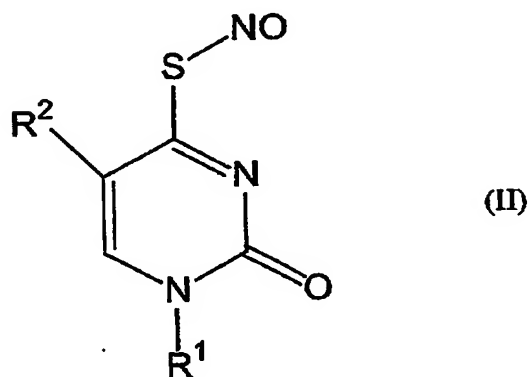
〔式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基（ $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

(2) 次式 (II) :

【0015】

【化8】



【0016】

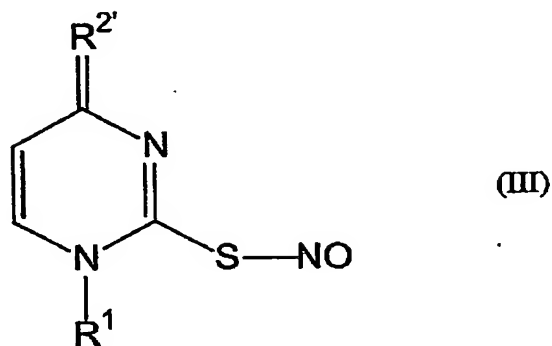
〔式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基（ $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

(3) 次式 (III) :

【0017】

【化9】



【0018】

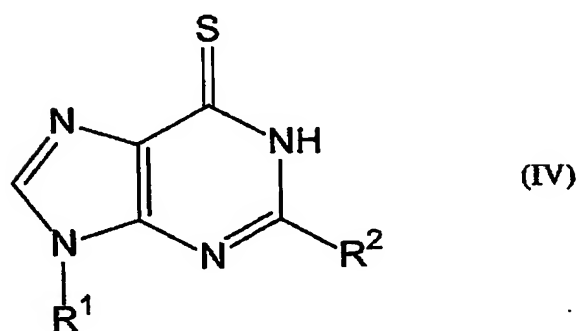
( $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^{2'}$ は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。)

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

(4) 次式 (IV) :

【0019】

【化10】



【0020】

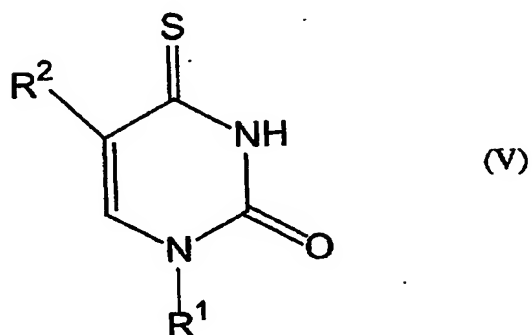
[式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基又は $R^3$ -アミノ基 ( $R^3$ は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1~15のアシル基を表す。)を表す。]

で示されるチオヌクレオシドと S-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

(5) 次式 (V) :

【0021】

【化11】



【0022】

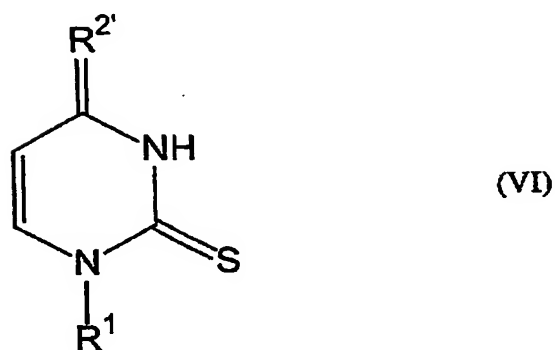
〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>-アミノ基 (R<sup>3</sup>は、置換されてもよい炭素数1~15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1~15のアシル基を表す。)を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドと S-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

(6) 次式 (VI) :

【0023】

【化12】



【0024】

〔式中、 $R^1$ はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、 $R^2$ は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。〕

で示されるチオヌクレオシドとS-ニトロシル化合物とを反応させることを特徴とするチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の製造方法。

(7) 前記(1)～(3)のいずれか1項に記載の誘導体又はその塩を含むオリゴ核酸。

#### 【0025】

本発明のオリゴ核酸としては、例えば少なくとも12塩基の長さを有するものが挙げられる。

(8) 前記(7)記載のオリゴ核酸と該オリゴ核酸に対する相補鎖とを反応させることにより、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその対応塩基に転移させることを特徴とするニトロシル基の転移方法。

(9) 前記(7)記載のオリゴ核酸とその相補鎖とを反応させ、得られる反応産物を酸性条件下で処理することを特徴とする塩基配列の変異誘発方法。

#### 【0026】

本発明の変異誘発方法は、オリゴ核酸とその相補鎖との反応産物において、前記オリゴ核酸に含まれるニトロシル基をその相補鎖側の対応塩基に転移させることにより、当該対応塩基をウラシルに変異させることを特徴とするものである。

(10) 前記(1)～(3)のいずれか1項に記載の誘導体並びに前記(7)記載のオリゴ核酸からなる群から選ばれる少なくとも1つを含む、塩基配列の変異誘発剤又は塩基配列の変異誘発用キット。

#### 【0027】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0028】

#### 【発明の実施の形態】

本発明の誘導体は、チオヌクレオシドの硫黄原子上にニトロシル基が結合した構造を有することを特徴とする。また、本発明の誘導体は、特定の塩基を認識しこれに結合することにより、自己が持つニトロシル基を相手の塩基に転移させることを特徴とするものである。

# 1. チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体

上記の一般式 (I)、(II) 又は (III) で示される本発明の化合物 (チオヌクレオチド-S-ニトロシル誘導体) において、 $R^1$  はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表す。 $R^2$  は、水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基、 $R^3$ -アミノ基を表す。 $R^{2'}$  は酸素原子、硫黄原子又はイミノ基を表す。

## 【0029】

ここで  $R^3$  は、置換されてもよい炭素数 1~15 のアルキル基又は置換されてもよい炭素数 1~15 のアシル基を表す。但し、アルキル基又はアシル基の炭素数は、好ましくは 1~10 であり、さらに好ましくは 1~5 である。

## 【0030】

アルキル基としては、直鎖、分枝鎖又は環状のいずれでもよく、例えばメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基、*n*-ドデシル基等が挙げられる。

## 【0031】

炭素数 1~15 のアシル基とは、直鎖状又は分岐して、置換されてもよいアルキルアシル基、置換されてもよいシクロアルキルカルボニル基、又は置換されてもよいベンゾイル基等を表す。

## 【0032】

例えば、アルキルアシル基としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、*n*-ブチリル基、イソブチリル基、2-メチルブチリル基、3-メチルブチリル基、ピバロイル基、バレリル基、2-メチルバレリル基、カプロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、デカノイル基等が挙げられる。

## 【0033】

また、シクロアルキルカルボニル基としては、シクロプロパンカルボニル基、シクロヘキサンカルボニル基、シクロペンタンカルボニル基等が挙げられる。

## 【0034】

置換されてもよいベンゾイル基において、フェニル基上の置換基は無置換でも

よく、フェニル基上の 2 位、3 位、4 位のいずれかの位置が置換されてもよい。  
また、複数の位置に置換基があってもよく、その場合の置換基は同一であってもそれぞれ異なるものでもよい。

#### 【0035】

フェニル基上の置換基としては、例えばアルキル基（メチル基、エチル基、イソプロピル基等）；アルキルオキシ基（メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロピルオキシ基等）；置換又は無置換アミノ基（ニトロ基、アミノ基、メチルアミノ基、エチルアミノ基、*n*-プロピルアミノ基、*i*-プロピルアミノ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等）；ハロゲン基（フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等）；アシル基（ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基等）；アシルオキシ基（ホルミルオキシ基、アセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基、ベンゾイルオキシ基等）；アミド基（ホルムアミド基、アセトアミド基、ベンズアミド基等）；芳香環（フェニル基等）などが挙げられる。

#### 【0036】

置換されてもよいベンゾイル基としては、具体的にはベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、2-メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、3, 5-ジニトロベンゾイル基、2-アミノベンゾイル基、3-アミノベンゾイル基、4-アミノベンゾイル基、4-ジメチルアミノベンゾイル基、2-クロロベンゾイル基、3-クロロベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基、2-ブロモベンゾイル基、3-ブロモベンゾイル基、4-ブロモベンゾイル基、3, 5-ジクロロベンゾイル基、2, 4-ジクロロベンゾイル基、パークロロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基等が挙げられる。

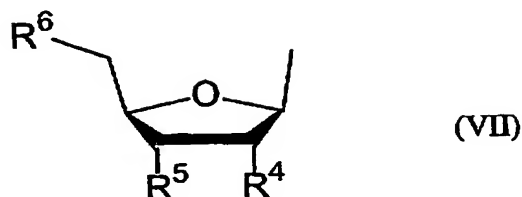
#### 【0037】

リボース又はデオキシリボースは、次式(VII)：

#### 【0038】



## 【化13】



## 【0039】

で示されるものである。ここで、式(VII)において、 $R^4$ は、水酸基（リボースの場合）又は水素原子（デオキシリボースの場合）を表す。 $R^5$ 及び $R^6$ は、リボース及びデオキシリボース並びにこれらの誘導体のいずれの場合であっても、互いに独立し、同一又は異なって、例えば水素原子、ハロゲン基、置換されてもよい水酸基を表す。

## 【0040】

$R^5$ 及び/又は $R^6$ においてハロゲン基とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を表す。また、 $R^4$ 及び/又は $R^5$ において置換された水酸基としては、一般的な水酸基の保護基となりうる置換基により置換された水酸基（例えばカルボン酸エステル、スルホン酸エステル、エーテル、ウレタン、シリル基等）を表す。

## 【0041】

水酸基の保護基としては、アルキル基（メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*t*-ブチル基、ペンチル基、ベンジル基、2-メトキシベンジル基、3-メトキシベンジル基、4-メトキシベンジル基、2-メチルベンジル基、3-メチルベンジル基、4-メチルベンジル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、ベンジルオキシメチル基、ベンジルオキシエチル基、アセトキシメチル基、アセトキシエチル基、ベンゾイルオキシメチル基、ベンゾイルオキシエチル基等）；アリール基（フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-フェニルフェニル基、2-ピリジニル基、3-ピリジニル基、4-ピリジニル基等）；アシル基（ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基、2-メトキシベンゾイル基、3-メトキシベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基

、2-メチルベンゾイル基、3-メチルベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、4-ニトロベンゾイル基、4-フェニルベンゾイル基等)；ウレタン基(アミノカルボニル基、ジメチルアミノカルボニル基、メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基、ジエチルアミノカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基等)；スルホン酸エステル基(メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基、2-メチルベンゼンスルホニル基、3-メチルベンゼンスルホニル基、4-メチルベンゼンスルホニル基、トリフルオロメタンスルホニル基、トリクロロメタンスルホニル基等)；シリル基(トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基等)が挙げられる。

#### 【0042】

本発明の式Iに示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの3',5'-ビス-*t*-ブチルジメチルシリル誘導体であり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。

#### 【0043】

本発明の式(II)に示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの3',5'-ビス-*t*-ブチルジメチルシリル誘導体であり、かつ、 $R^2$ がアミノ基のものが挙げられる。

#### 【0044】

本発明の式(III)に示される化合物のうち、好ましい例としては $R^1$ がデオキシリボースであり、かつ、 $R^{2'}$ が酸素原子又はイミノ基のものが挙げられる。さらに好ましくは、 $R^1$ がリボース又はデオキシリボースの3',5'-ビス-*t*-ブチルジメチルシリル誘導体であり、かつ、 $R^{2'}$ が酸素原子又はイミノ基のものが挙げられる。

## 2. 本発明の化合物の製造

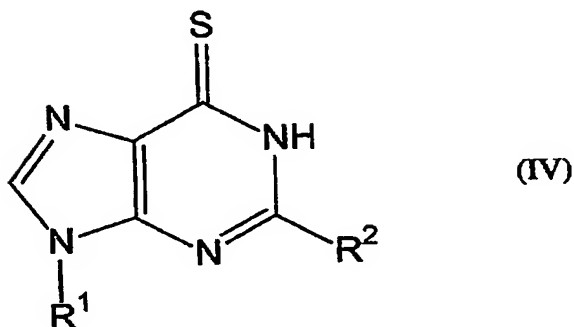
一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物は、既知の反応を工夫することにより合成することができる。

## (1) 式(I)で示される化合物の製造

本発明において、式(I)で示される化合物を製造する場合は、次式(IV)：

【0045】

【化14】



【0046】

(R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は前記と同様である。)で示されるチオヌクレオシド化合物とニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

【0047】

すなわち、(IV)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液(pH 10)に溶解し、約0.5 mM濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬(約1 mM)を加え室温で12時間反応させる。反応液をHPLC(ODSカラム、溶媒:0.1 M 酢酸トリエチルアミン-アセトニトリル:10%から30%、リニアグラジエント、254 nmで検出)で精製し、目的のS-ニトロシル体を得る。(IV)に示す化合物が難水溶性の場合は、有機溶媒(例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど)に溶解し、トリエチルアミンを原料の10倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えばS-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

【0048】

亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液(pH 3)に溶解し、約10倍当量用いて行う。

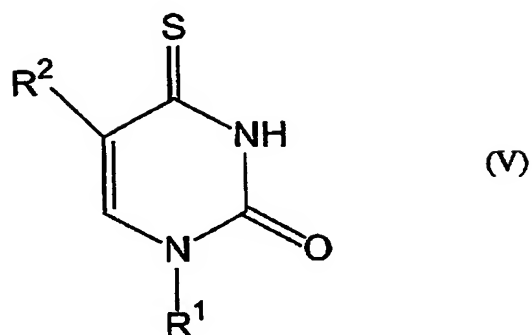
【0049】

## (2) 式(II)で示される化合物の製造

また、式(II)で示される化合物を製造する場合は、次式(V)：

【0050】

【化15】



【0051】

(R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は前記と同様である。)

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

【0052】

すなわち、(V)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液 (pH 10) に溶解し、約0.5 mM濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬 (約1 mM) を加え室温で12時間反応させる。反応液をHPLC (ODSカラム、溶媒: 0.1 M 酢酸トリエチルアミン-アセトニトリル: 10%から30%、リニアグラジエント、254 nmで検出) で精製し、目的のS-ニトロシル体を得る。(IV)に示す化合物が難水溶性の場合は、有機溶媒 (例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど) に溶解し、トリエチルアミンを原料の10倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えばS-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

【0053】

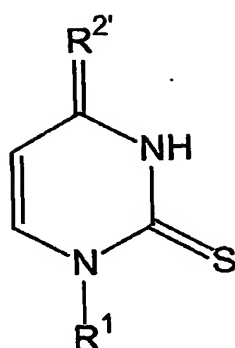
亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液 (pH 3) に溶解し、約10倍当量用いて行う。

(3) 式 (III)で示される化合物の製造

式 (III)で示される化合物を製造する場合は、次式 (VI) :

【0054】

## 【化16】



(VI)

## 【0055】

(R<sup>1</sup>及びR<sup>2'</sup>は前記と同様である。)

で示されるチオヌクレオシドとニトロシル化合物とを反応させる。反応の一例を以下に示す。

## 【0056】

すなわち、(VI)に示す化合物が水溶性の場合は、炭酸緩衝液 (pH 10) に溶解し、約0.5 mM濃度の溶液を調製する。この溶液にニトロシル化試薬 (約1 mM) を加え室温で12時間反応させる。反応液をHPLC (ODSカラム、溶媒: 0.1 M 酢酸トリエチルアミン-アセトニトリル: 10%から30%、リニアグラジエント、254 nmで検出)で精製し、目的のS-ニトロシル体を得る。(IV)に示す化合物が難水溶性の場合は、有機溶媒 (例えばアセトニトリルあるいはメタノールなど) に溶解し、トリエチルアミンを原料の10倍当量加えて反応させる。ニトロシル化試薬としては、例えばS-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン、一酸化窒素などが挙げられる。

## 【0057】

亜硝酸ナトリウムを用いて反応を行う場合には、酸性緩衝液 (pH 3) に溶解し、約10倍当量用いて行う。

## (4) 本発明の化合物の塩

上記一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物は、酸付加塩又は塩基付加塩を形成する場合があるが、このような塩も本発明の範囲に包含される。本発明の化合物を生体に適用可能なオリゴ核酸及びその製造中間体として用いる

場合には、塩としては生理的に許容されるものが好ましい。塩基付加塩としては、例えば、トリエチルアミン、ジメチルアミン、アンモニア、ジエチルアミン等のアミン類の塩、又はナトリウム、カリウム、カルシウム、若しくはマグネシウム等の金属類の塩を挙げることができる。酸付加物として例えば、塩酸、硫酸、若しくは過塩素酸等の鉱酸類の塩；又はシュウ酸、フマル酸、マレイン酸、酢酸、プロピオン酸、メタンスルホン酸、若しくはp-トルエンスルホン酸等の有機酸等との塩を挙げることができる。

### 3. オリゴ核酸

一般式(I)、(II)又は(III)で示される本発明の化合物はヌクレオシドであるため、これにリン酸をエステル結合させるとヌクレオチドとなり、核酸の構成成分となる。

#### 【0058】

このようにして得られたヌクレオチドは、適当なオリゴ核酸に組み入れて、配列特異的にニトロシル基を転移するオリゴ核酸として使用することができる。「ニトロシル基を転移する」とは、本発明のオリゴ核酸中のニトロシル基（本発明の化合物中に存在するニトロシル基）を、当該オリゴ核酸と反応する相手側の核酸中の塩基であって2本鎖（錯体）を形成している当該相手側の塩基（標的塩基ともいう）に転移することを意味する（図1）。

#### 【0059】

本発明のオリゴ核酸の配列は、特に限定されるものではなく、鋳型となる核酸配列に応じて設計することも、ランダムな塩基配列となるように設計することもできる。ある遺伝子の塩基配列にニトロシル基を転移させようとする場合は、当該遺伝子の標的塩基配列に相補的となるようにオリゴ核酸を設計することができる（この場合、本発明のオリゴ核酸側から見れば、当該遺伝子の塩基配列がオリゴ核酸の相補鎖となる）。本発明のオリゴ核酸をランダムな塩基配列となるように設計した場合は、そのいずれかの塩基にニトロシル基が導入されている。従ってこれらのニトロシル基を転移させるように、上記ランダムな塩基配列に相補的な配列を有する核酸を合成することができる（この場合、本発明のオリゴ核酸側から見れば、その合成された核酸がオリゴ核酸の相補鎖となる）。

## 【0060】

本発明のオリゴ核酸配列の長さは、その標的塩基に本発明の化合物中のニトロシル基を転移することができる限り特に限定されるものではない。本発明においては、少なくとも12塩基を有していることが好ましく、15～22塩基であることがより好ましい。本発明の化合物をオリゴ核酸中に組み入れる位置は、任意の位置でよいが、特に配列特異性を発現させる場合には、本発明の化合物が、好ましくはオリゴ核酸の両末端より3番目より内側に位置するように組み入れるとよい。例えば、図5において、本発明のオリゴ核酸7は16塩基を有しており、そのうち本発明の化合物は5番目に位置している。さらに、本発明のオリゴ核酸中に含まれる本発明の化合物は、1箇所である必要はなく、複数箇所であってもよい。すなわち、本発明のオリゴ核酸において、ニトロシル基を導入する標的塩基の数は特に限定されるものではない。そして、誘導体の存在位置が複数箇所の場合は、2箇所以上連続してもよく、不連続でもよい。

## 【0061】

オリゴ核酸の製造は、既知の方法、市販の核酸合成用試薬及び核酸合成装置より合成することができる。以下に(IV) [ $R^1$ が2-デオキシリボースのもの]を用いた合成例について記す。(IV)の5'-O-p-ジメトキシトリチル-3'-O-( $\beta$ -シアノエチル-ジイソプロピルフォスフォロアミダイト)体(約80 mmol)を無水アセトニトリルに溶解し、DNA自動合成装置(Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer)に装着する。合成装置内蔵の標準プログラムによって、1  $\mu$ molカラムを用いて合成終了後、28%アンモニア水中にて固相カラムから切り出し、55℃にて5時間加温して塩基の脱保護を行い、ODSカラムを接続したHPLCにて精製する(ODSカラム、アセトニトリル-0.1 M TEAA=10%-40% リニアグラジュエント/20分)。さらに、ポーラスカラムでp-ジメトキシトリチル基の脱保護および精製を行う(50 mM 酢酸アンモニア, pH10  $\rightarrow$  5%アセトニトリル-50 mM 酢酸アンモニア $\rightarrow$ 2%トリフルオロ酢酸 $\rightarrow$ 50 mM 酢酸アンモニア $\rightarrow$ 65%メタノール)。純度検定および構造確認はMALDI-TOF MS (Perseptive Biosystems, Voyager Elite, 3-hydroxy-2-picolinic acid-diammonium hydrogen citrate matrix)による分子量測定によって行うことができる。

#### 4. ニトロシル基の転移反応

一般式 (I)、(II) 又は (III) で示される化合物がニトロシル基を転移する機構は、図 1 に示すように相補的な水素結合で形成される錯体構造中で実現される。なお、このような機能を損なわない限り、一般式 (I)、(II) 又は (III) において複素環に結合している  $R^2$  には、水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、 $R^3$ -オキシ基、 $R^3$ -アミノ基、あるいはその他のヘテロ原子 ( $R^3$  は前記と同様である) を導入することも可能である。

##### 【0062】

反応条件は、例えば、一般式 (I) で示される化合物を組み込んだ核酸 (約  $25 \mu\text{M}$ ) と相補的な配列の DNA (約  $25 \mu\text{M}$ ) を  $0.05 \text{ M MES}$ ,  $0.1 \text{ M NaCl}$  を含む緩衝液 (pH 7) に溶解し、室温で反応させる。反応の進行は HPLC (ODS カラム、アセトニトリル- $0.1 \text{ M TEAA}$ =10%-40% リニアグラジエント/20 分) で追跡することができる。

##### 【0063】

一般式 (I)、(II) 又は (III) で示される本発明の化合物は、その塩基の種類に応じて遺伝子の特定の塩基を認識し、これに結合することができ、さらに、化合物 (I)、(II) 又は (III) から製造され該化合物を構成成分として含有するオリゴ核酸は、そのような塩基を含む 1 本鎖核酸とハイブリダイズさせて 2 本鎖を形成することができる。

##### 【0064】

ハイブリダイゼーションはストリンジェントな条件下で行われる。ストリンジェントな条件とは、例えば、塩 (ナトリウム) 濃度が  $50 \sim 900 \text{ mM}$  であり、温度が  $10 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、好ましくは塩 (ナトリウム) 濃度が  $50 \sim 150 \text{ mM}$  であり、温度が  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  での条件をいう。

##### 【0065】

例えば、下記の実施例に示すように、塩基構造として式 (I) に示すプリン塩基 (例えばグアニン) を用いた場合には、化合物 (I) は対応するシトシン塩基を認識し、この塩基を含む核酸に対して特異的にニトロシル基転移反応を実現するのに有用である。なお、「対応する」とは、それぞれの塩基に対して相補的で



あることを意味する。従って、例えばグアニンに対応する塩基はシトシンとなる。

#### 【0066】

水素結合形成のための塩基が他のものでも同様であり、式 (II) 又は (III) におけるピリミジン塩基 (シトシン、チミン) を使用した場合は、対応する塩基 (それぞれ G、A) に対する反応も可能である。

#### 【0067】

反応は、図 1 に示す水素結合錯体内で実現される。さらに、N-ニトロソシトシンはウラシルに加水分解されることが報告されている (例えば R. Glazer, R. Sundeeep, M. Lewis, M.-S. Son, S. Meyer, J. Amer. Chem. Soc., 121, 6108 (1999) など)。そこで、本発明においては、配列特異的にシチジンをデオキシウリジンに変換することができる (図 2)。すなわち、オリゴ核酸中のシトシンがウラシルに変異する。このときの変換反応は、酸性条件下で行われる。酸性条件は水溶液あるいは有機緩衝溶液などの反応溶液に、塩酸、酢酸、硫酸、リン酸などを加え pH 2 ~ 6、好ましくは 4 ~ 5 に調節する。さらに各種の有機酸などを用いて pH を調整することもできる。反応温度は 10 ~ 30℃、好ましくは 15 ~ 25℃であり、反応時間は 10 ~ 40 時間、好ましくは 20 ~ 30 時間である。

#### 【0068】

本発明の化合物は、配列特異的ニトロシル基転移反応により NO 活性種を特定の場所に運ぶ、いわゆるドラッグデリバリー用化合物として利用することが可能である。

#### 【0069】

##### 5. 塩基配列の変異誘発剤又は変異誘発用キット

本発明の化合物又はオリゴ核酸は、塩基配列の変異誘発剤又は変異誘発用キットとして使用することができる。本発明の変異誘発剤又はキットは、本発明の化合物又はオリゴ核酸のうち少なくとも 1 つを含むものであり、全部を含めることもできる。「塩基配列」とは、DNA、cDNA、RNA、mRNA、などの核酸の塩基配列を意味し、生物由来のものであると人工的に合成されたものであるとを問わない。鋳型となる核酸は、細菌、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、あるいは哺乳

動物などから公知手法により採取することができ、ゲノム、プラスミドなど、核酸を有するあらゆるものを使用することができる。

#### 【0070】

オリゴ核酸は、上記鋳型核酸の塩基配列のうち、変異を誘発させたい塩基の位置と同じ位置に本発明の化合物が位置するように、すなわち、鋳型となる塩基配列にハイブリダイズするように合成する。合成後は、目的の鋳型核酸とハイブリダイズさせ、前記のニトロシル転移反応を行い、前記の酸性条件下で処理すればよい。

#### 【0071】

本発明のキットには、本発明の化合物のほか、ハイブリダイゼーション溶液、洗浄用緩衝液、蛍光発色試薬などを含めることができる。

#### 【0072】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0073】

##### 【実施例1】 チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の合成

既知の方法 (M. Kadokura, T. Wada, K. Seio, and M. Sekine J. Org. Chem., 65, 5104-5113 (2000) ) により合成した2'-デオキシ-6-チオグアノシン (t-ブチルジメチルシリル誘導体) ( $0.25 \mu\text{mol}$ )、SNAP (2, S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン) ( $0.25 \mu\text{mol}$ )、トリエチルアミン ( $0.28 \mu\text{mol}$ ) のメタノール溶液 ( $500 \mu\text{l}$ ) を  $0^\circ\text{C}$  にて攪拌した。反応液を直接HPLC-MSに注入し、ESI-MSを測定した(図4)。HPLC条件は以下の通りである。

#### 【0074】

カラム: Cadenza C18 2x50 mm

カラム温度:  $25^\circ\text{C}$

移動相: A= $\text{H}_2\text{O}$ , B= $\text{CH}_3\text{CN}$ , %B=60-100%/5min then 100% 20 min

流速:  $0.2 \text{ mL/min}$

UV: 254nm。

## 【0075】

HPLC溶出液をスプリッターで分離し、約1/40(約5  $\mu$ L) を質量分析器に導入した。質量分析はポジティブモードESI-TOFで行った。MS条件(Applied biosystem Mariner System 5299)は、Spray Tip Potential, 4006, Nozzle potential 300, Nozzle temperature 140により行った。

## 【0076】

質量分析結果を以下に示す。

## 【0077】

$t_R$  1.1 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 541.1705, calcd 541.2443 for 3 (C<sub>22</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>),  $t_R$  7.8 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 701.4343, calcd 701.3001 for 4 (CHNSOSi),  $t_R$  15.0 min, MS  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> found 1021.4972, calcd 1021.4854 for 5 (C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>4</sub>).

図4で示した時間経過の観察から、図3のスキーム3又は4に示す化合物が合成されていることが示された。

## 【0078】

〔実施例2〕 オリゴ核酸の合成

既知の方法で合成したS-(2-シアノエチル)-2'-デオキシ-6-チオグアノシンの5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)体を、DNA合成装置(型名:DNA/RNA Synthesizer、Applied Biosystems社)によりオリゴヌクレオチドに導入した。その後、28%アンモニア水中、55℃で5時間加熱することによりオリゴヌクレオチド6(図5のスキーム6:配列番号1)を得た。オリゴヌクレオチド6(150 nmol)及びSNAP(3  $\mu$ mol)を炭酸塩緩衝液(pH 10.0) 300  $\mu$ lに溶解し、室温で12時間放置した。HPLCで反応の進行を確認した後、同じHPLC条件で新しく生成したピークを単離した。その結果、図5のスキーム7に示すオリゴヌクレオチド7(配列番号2)を得た。260nmでのUV吸光度により、収率は31%であった。また、MALDI-TOFMASSによる分子量測定を行った結果、理論値4797.76に対応する分子量4796.69の測定値を観測した。

## 【0079】

〔実施例3〕 化合物7の分解による[NO<sup>+</sup>]の発生試験

蛍光セル中にオリゴヌクレオチド7 (図5) のMES緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl, pH5およびpH7に調製、1.5 mL、オリゴヌクレオチド7:0.5  $\mu$ M) を入れ、この溶液にDAF-2 (diaminofluorescein、最終濃度4  $\mu$ M)を加え25℃にて攪拌した。この反応溶液の蛍光スペクトル (励起波長488 nm, 蛍光波長500-600 nm) を経時的に測定した。また、同時にこの溶液から経時的に1  $\mu$ lをサンプリングし、HPLCに注入してオリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6への変化を観測した。

#### 【0080】

512 nmにおける蛍光強度の相対値及びオリゴヌクレオチド6への変化率をグラフに表した (図6)。pH5ではオリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6への変化と、同時に測定したDAF-2の蛍光強度の増大曲線 (図7) とがよく一致する傾向を示した。このことから、オリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6への変化に伴い、[NO<sup>+</sup>]等価化学種がオリゴヌクレオチド7から溶液に放出されたことが示された。一方、pH7の反応溶液ではオリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6への変化は殆ど起こらず、またDAF-2の蛍光強度にも殆ど変化がなかった (図7)。これらの結果から、オリゴヌクレオチド7 は[NO<sup>+</sup>]等価化学種の前駆体となっていることが判明した。

#### 【0081】

【実施例4】オリゴヌクレオチド7とその相補的オリゴヌクレオチド8との反応

オリゴヌクレオチド7 (図8のスキーム7) とオリゴヌクレオチド8 (図8のスキーム8: 配列番号3) をそれぞれ約20  $\mu$ M含むMES緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl, pH7) を、25℃で12時間反応させた。反応液を定期的にサンプリングし、HPLCに注入しオリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6 (図8のスキーム6) への変化を観測した (図9)。

#### 【0082】

HPLC条件は以下の通りである。

#### 【0083】

カラム: Nacalai tesque, COSMOSIL 5C18-MS (4.6x250mm)

移動相: A=0.1M TEAAバッファー、B=CH<sub>3</sub>CN, 10% to 30%/ 20min, linear gradient

流速: 1.0ml/min

UVモニター: 260nm

オリゴヌクレオチド7の相補鎖であるオリゴヌクレオチド8が存在しないときには、オリゴヌクレオチド7は殆ど変化しなかった。また、相補鎖の標的塩基がX=A, G, Tの時にも反応は殆ど起きなかった。一方、相補鎖の標的塩基がX=Cの時には速やかな変化が起こり、オリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6が再生した。なお、HPLCでは、オリゴヌクレオチド9 (図8のスキーム9: 配列番号4) は別のピークとして観測されなかった。

#### 【0084】

このようなオリゴヌクレオチド7からオリゴヌクレオチド6の生成の経時変化をグラフにすると、この反応が標的塩基X=Cに非常に特異的であることが示された(図10)。このことは、反応が図1に示す2本鎖DNA錯体中で進行したことを示している。さらに、オリゴヌクレオチド7とオリゴヌクレオチド8(X=C)との反応溶液にDAF-2を共存させて蛍光スペクトルの変化を追跡したところ、蛍光強度は殆ど変化しなかった。このことから、この反応でオリゴヌクレオチド7から放出された[NO<sup>+</sup>]等価化学種は溶液中に放出されていないことが確認された。また、オリゴヌクレオチド8を単離し凍結乾燥後、4 μM DAF-2溶液に加えたところ、蛍光強度が増大し、[NO<sup>+</sup>]等価の化学種が相補鎖8(X=C)に転移していることが示唆された。

#### 【0085】

【実施例5】 反応後の相補的オリゴヌクレオチド8 (X=C)の酸処理および酵素加水分解

図11に示すように、オリゴヌクレオチド7とオリゴヌクレオチド8をそれぞれ約20 μM含むMES緩衝溶液 (0.05 M MES, 0.1 M NaCl, pH7) を、25℃で12時間反応させた。その後、溶液をpH5に調製し同じ温度でさらに30時間放置した。さらにこの反応液を0.1%酢酸水溶液に対して透析した。

#### 【0086】

HPLC条件は以下の通りである。

【0087】

カラム: XTerra MSC18 (2.1x150mm)

移動相: A=0.1M TEAAバッファー、B=CH<sub>3</sub>CN, 10% to 20%/10min, 20% to 100%/20min, linear gradient

流速: 0.3ml/min

UVモニター: 254nm

その結果、オリゴヌクレオチド6はこれらの処理によっても全く変化せず(図11)、MALDI-TOF MS測定によっても変化が認められなかった。相補鎖8のピークは0.1%酢酸水溶液に対する透析によってピークが分かれた。保持時間の長い(2.2分)ピークの化合物はMALDI-TOF MSにより相補鎖8(X=C)と同じ分子量であり、また酵素加水分解(BAPとVPDEを含む緩衝液、0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 37度C)によってC, A, Gを約1:10:5の比率を与えたことから、未反応オリゴヌクレオチドの8であることが確認された(図12)。一方、保持時間の短い(1.7分)ピークはMALDI-TOF MS測定によるとオリゴヌクレオチド8(X=C)と同じ分子量ピークを与えたが、酵素加水分解によって2'-デオキシウリジンと一致するピークを生成した。従って、オリゴヌクレオチド9の12番目の塩基C(3'末端から5番目)が酸性条件下で変化しオリゴヌクレオチド8の対応塩基(X=dU)と変化したこと(シトシンからウラシルへの変異)が示された(図12)。

【0088】

【発明の効果】

本発明により、チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体が提供される。本発明の誘導体は、そのニトロシル基を配列特異的かつ塩基特異的に転移させることができ、相補鎖の塩基を置換させることができるため、標的塩基の点変異誘発用ツールとして有用である。

【0089】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1: 合成ヌクレオチド

配列番号1: nはCのチオヌクレオチド誘導体を表す(存在位置: 5)

配列番号 2 : 合成ヌクレオチド

配列番号 2 : nはCのチオヌクレオチドニトロシル誘導体を表す (存在位置: 5

)

配列番号 3 : 合成ヌクレオチド

配列番号 3 : nはa, g, c又はtを表す (存在位置: 12)。

配列番号 4 : 合成ヌクレオチド

配列番号 4 : nはa, g, c又はtのニトロシル誘導体を表す (存在位置: 12)。

配列番号 5 : 合成ヌクレオチド

配列番号 5 : nはuを表す (存在位置: 12)。

【0090】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> KYUSHU TLO

<120> Thionucleoside-S-nitrosyl derivatives

<130> P03-0049

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 5

<223> n represents thionucleotide derivative of C

<400> 1

ctttnttctc ctttct

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 5

<223> n represents thionucleotide nitrosyl derivative of C



<400> 2

ctttnttctc ctttct

16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents a, g, c or t

<400> 3

agaaaggaga anaaag

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents nitrosyl derivative of a, g, c or t

<400> 4

agaaaggaga anaaag

16

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
nucleotide

<220>

<221> modified base

<222> 12

<223> n represents u

<400> 5

agaaaggaga anaaag

16

【図面の簡単な説明】

**【図 1】**

本発明の誘導体によるニトロシル基の転移を示す図である。

**【図 2】**

N-ニトロソ体のカルボニル基への加水分解反応を示す図である。

**【図 3】**

本発明の誘導体の合成工程を示す図である。

**【図 4】**

HPLCの結果を示す図である。

**【図 5】**

本発明のオリゴ核酸の合成工程を示す図である。

**【図 6】**

HPLCの結果を示す図である。

**【図 7】**

DAF-2の蛍光強度の増大曲線を示す図である。

**【図 8】**

オリゴヌクレオチドとその相補鎖との反応を示す図である。

**【図 9】**

HPLCの結果を示す図である。

**【図 10】**

オリゴヌクレオチド6の生成の経時変化を示す図である。

**【図 11】**

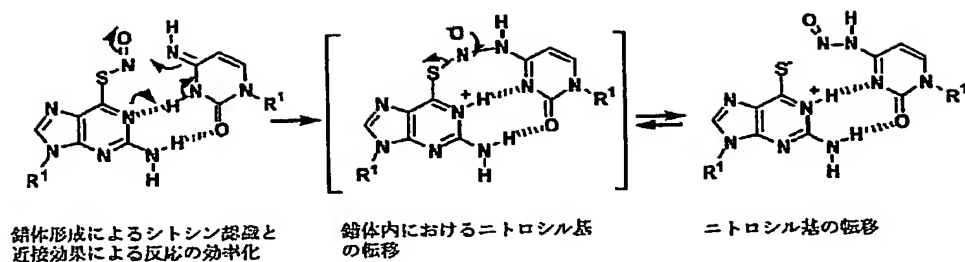
オリゴヌクレオチド7とオリゴヌクレオチド8との反応を示す図である。

**【図 12】**

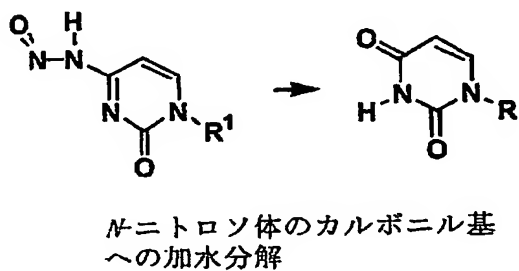
オリゴヌクレオチド9のシトシンがウラシルに変異したことを示す図である。

## 【書類名】 図面

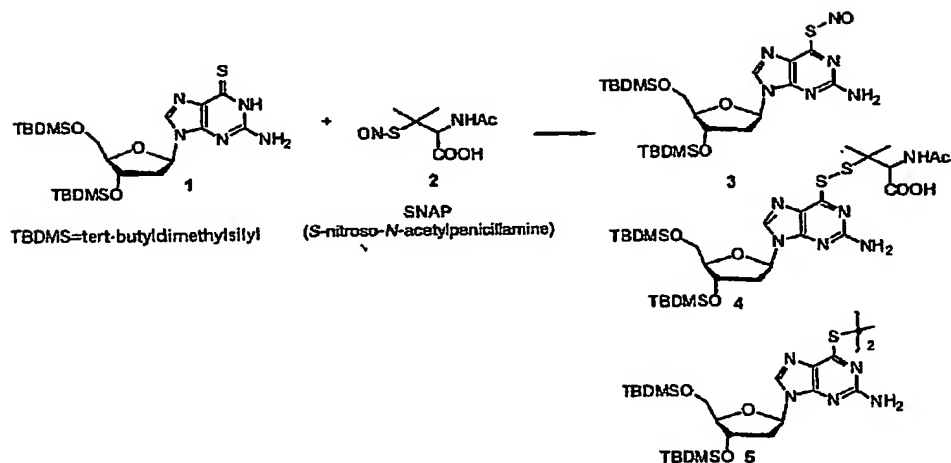
## 【図 1】



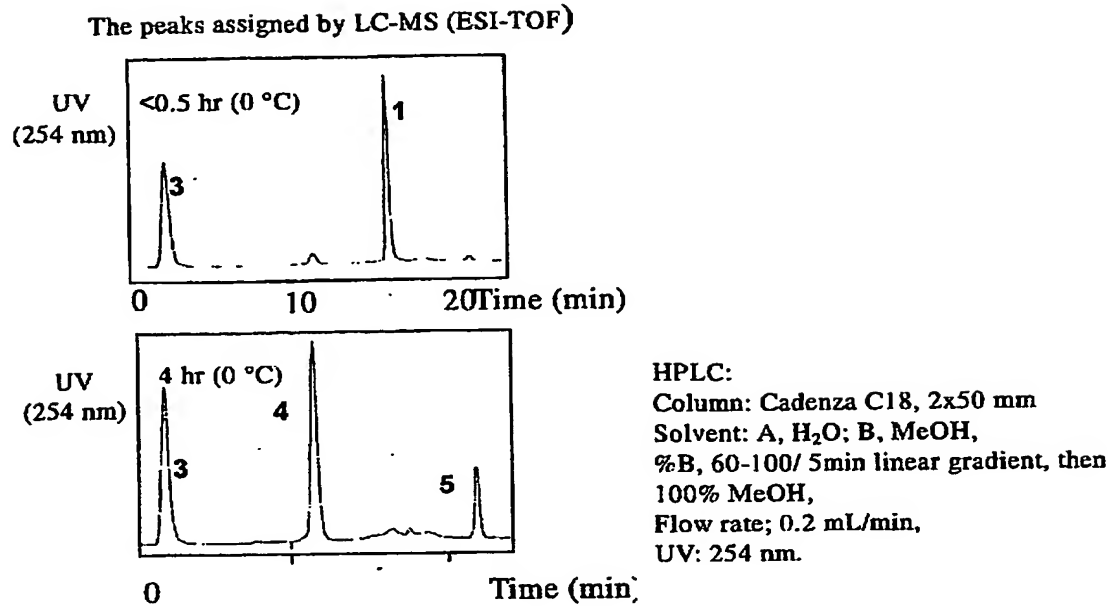
## 【図 2】



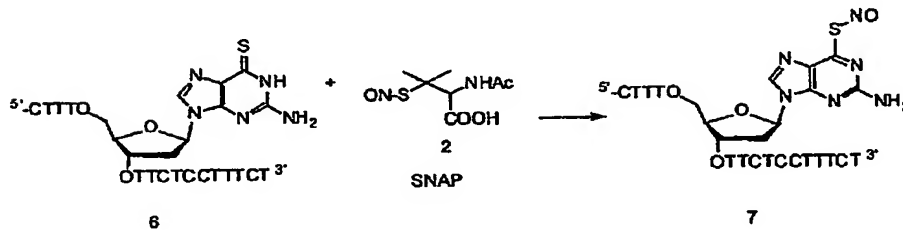
## 【図 3】



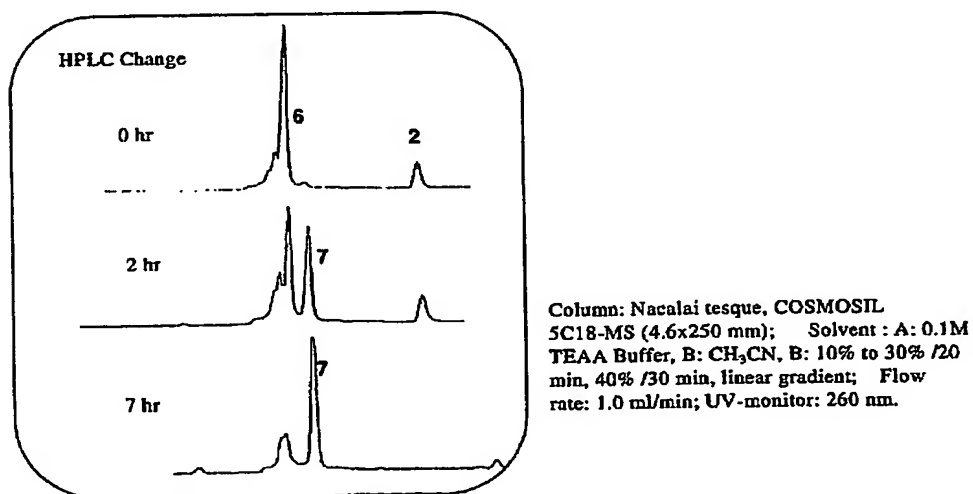
【図 4】



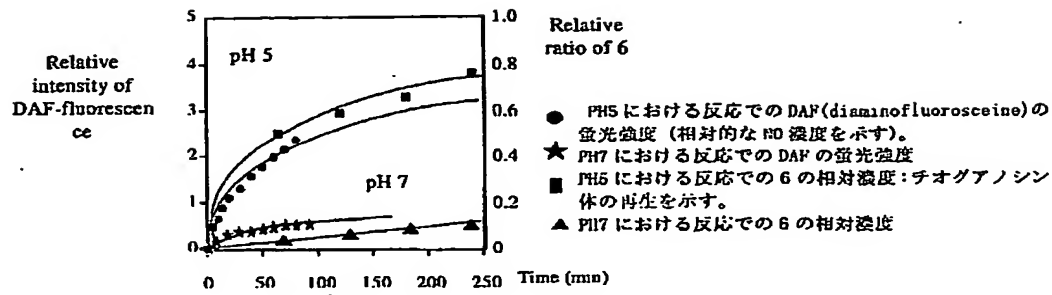
【図 5】



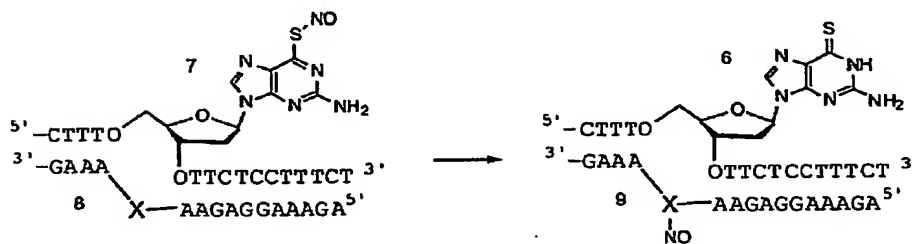
【図 6】



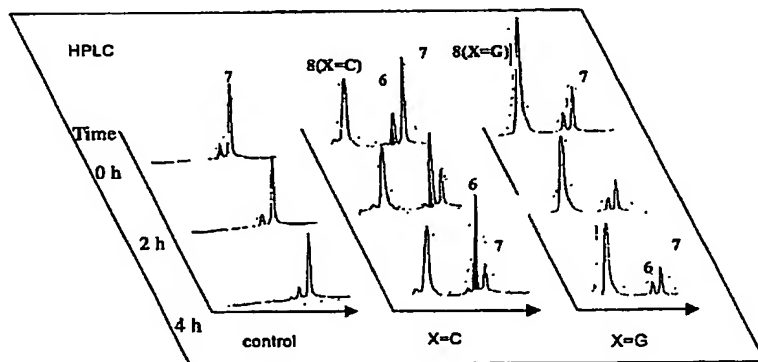
【図 7】



【図 8】



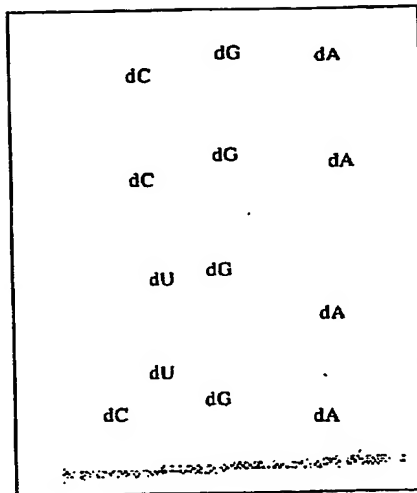
【図 9】



Column: Nacalai tesque, COSMOSIL 5C18-MS (4.6x250 mm); Solvent: A: 0.1M TEAA Buffer, B: CH<sub>3</sub>CN, B: 10% to 30% /20 min, 40% /30 min, linear gradient; Flow rate: 1.0 ml/min; UV-monitor: 260 nm.



【図 12】



未反応 8(X=C) の加水分解混合物

図 11 ピーク (8) の加水分解混合物

図 11 ピーク (10) の加水分解混合物

標準サンプルのクロマトグラム

Column: XTerra MSC18 (2.1x150 mm); Solvent: A: 0.1M TEAA Buffer, B: CH<sub>3</sub>CN, B: 10% to 20% /10 min, 20% to 100%/20 min, linear gradient; Flow rate: 0.3 ml/min; UV-monitor: 254 nm.



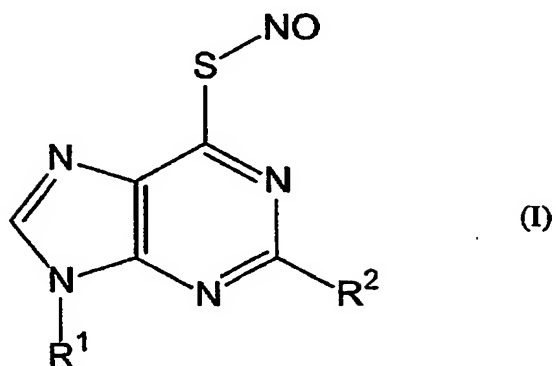
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 チオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体の提供。

【解決手段】 次式 I :

【化 1】



〔式中、R<sup>1</sup>はリボース、2-デオキシリボース又はこれらの誘導体を表し、R<sup>2</sup>は水素原子、アミノ基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、R<sup>3</sup>-オキシ基又はR<sup>3</sup>-アミノ基（R<sup>3</sup>は、置換されてもよい炭素数1～15のアルキル基又は置換されてもよい炭素数1～15のアシル基を表す。）を表す。〕

で示されるチオヌクレオシド-S-ニトロシル誘導体又はその塩。

【選択図】 なし

特願 2003-117569

出願人履歴情報

識別番号

[800000035]

1. 変更年月日

2000年10月18日

[変更理由]

住所変更

住所

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

氏名

株式会社産学連携機構九州